

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-056692

(43)Date of publication of application : 04.04.1983

(51)Int.Cl.

C12P 19/26
// (C12P 19/26
C12R 1/46)

(21)Application number : 56-152355

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 26.09.1981

(72)Inventor : AKASAKA HIDEMICHI
KOMAZAKI HISAYUKI
YANAGI MITSUO

(54) PREPARATION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare the titled substance, by culturing hyaluronic acid-producing bacteria belonging to Streptococcus genus in a nutrient medium containing more than specific amount of a saccharide component as a main carbon source, and separating the objective substance produced and accumulated in the medium.

CONSTITUTION: Hyaluronic acid-producing bacteria belonging to Streptococcus genus, e.g. Streptococcus pyogenes, Streptococcus equi, Streptococcus equisimilis, etc. are cultured in a medium containing $\geq 3\%$ saccharide component such as glucose, sucrose, galactose, etc. as a main carbon source, and a nitrogen source, inorganic salts, minor organic nutrients, etc. under aeration and agitation, and the accumulated hyaluronic acid is separated from the medium. The separation can be carried out by conventional method for the separation of polysaccharides.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—56692

⑤ Int. Cl.³

C 12 P 19/26

// (C 12 P 19/26

C 12 R 1/46)

識別記号

庁内整理番号

7258—4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)4月4日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ ヒアルロン酸の製造方法

① 特 願 昭56—152355

② 出 願 昭56(1981)9月26日

③ 発 明 者 赤坂日出道
横浜市戸塚区公田町286番地の
6

④ 発 明 者 駒崎久幸
横浜市旭区柏町53番地の6

⑤ 発 明 者 柳光男
相模原市御園1丁目13番地の7

⑥ 出 願 人 株式会社資生堂
東京都中央区銀座7丁目5番5
号

明 細 書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 糖成分3%以上を主炭素源とする栄養培地に、ストレプトコッカス属のヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を通気攪拌培養して、培養液中にヒアルロン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする微生物によるヒアルロン酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物によるヒアルロン酸の製造方法に関するものである。

従来、ヒアルロン酸はウシの眼のガラス液、ニワトリのトサカ、このほか臍帯、関節液等より単離され、タンパク質および水と結合してゼリー状を保ち、潤滑剤的な役割、バクテリアの侵入からの保護、水分の保持等に役立っている。

しかし、極めて高価であることが問題点であった。

一方ストレプトコッカス属細菌を利用したヒア

ルロン酸の生成についてはストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エキ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・エキシミリス (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ (*Streptococcus dysgalactiae*) およびストレプトコッカス・ゾーエピデミカス (*Streptococcus zooepidemicus*) 等の細菌によりヒアルロン酸を生産する事がすでに知られている。その報告はホルムストレーム (B. Holmström Appl. Microbial 1967)、ジェー・ビー・ウールコック (J. B. Woolcock 85, 372~375 J. Gen. Microbial 1974)、イー・キム (E. Kjem Acta Pathol. Microbial. Scand 1976) らによってすでに報告されている。しかしいずれも大量生産を目的としたものではなく、グルコース1%、培養時間24時間、pH 7.0~7.6、温度30~37℃等の条件で行なうもので収量は0.6g/l以下と低いものであった。

本発明者らは簡単で安価な培地でヒアルロン酸を収量良く安定に生成せしめる事を意図して鋭意研究した結果、特定の条件で上記細菌を培養する

特開昭58-56692(2)

(1)より収量が増加する事

事を見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は糖成分3%以上を主炭素源とする栄養培地にてストレプトコッカス属のヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を通気攪拌培養し、培養液中にヒアルロン酸を生成せしめ、これを採取するものである。

(以下余白)

本発明のヒアルロン酸を生産する能力を有する細菌としてはストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・エキ、ストレプトコッカス・エキシミリリス、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ、ストレプトコッカス・ズーエビデミカス等があげられる。

本発明においてヒアルロン酸の生産は上記ヒアルロン酸生産菌を特定の栄養培地にて培養することにより行なわれる。培地としては、炭素源、窒素源、無機塩及びその他に必要なならば有機微量栄養素を含有する培地がよい。炭素源としては例えば有機酸、脂肪族アルコール等いろいろあるが本発明では澱粉加水分解物、グルコース、蔗糖、ガラクトース、フラクトース等の糖分が必須成分として必要である。

(硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム)

次に窒素源としては硫酸アンモニウム、ペプトン、各種アミノ酸混合物、酵母エキス等の一般的な原料が用いられる。

さらにこの他に塩化ナトリウム、あるいはマグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム等の磷酸塩

硫酸塩あるいは炭素塩等及び微量のビタミン類が必要に応じて添加される。

ヒアルロン酸の収量増加には炭素源のうちグルコースを用いると特に良い結果が得られる。糖の添加は一度に多量添加するよりも少量に分割して適時添加する方が良い結果となる。糖の濃度は3%以上添加するとヒアルロン酸の生産量が1%の時に比べ顕著に増加する。その濃度は6~8%添加すれば十分で、これ以上添加しても収量の増加はない。3%未満では本発明の効果は発揮出来ない。

表-1に培地組成を示した。培地中のグルコースの添加量を変えて培養した結果を表-2に示した。グルコース3%以上添加の場合は1%と比較するとかなり収量が増加する事が分かる。すなわち、

表-1 培地組成の比較

培地組成	添加量%			
グルコース	1	3	4	8
酵母エキス	0.5	0.5	0.5	0.5
ペプトン	1.5	1.5	1.5	1.5
リン酸第1水素カリウム	0.2	0.2	0.2	0.2
チオ硫酸ナトリウム	0.11	0.11	0.11	0.11
亜硫酸ナトリウム	0.02	0.02	0.02	0.02

pH 5.5 ~ 9.0、温度 30 ~ 44 °C、通気量 1 ~ 2 l/min

培養時間 (1 ~ 4 日)

表-2 培養条件(通気の有無とグルコース量)と

ヒアルロン酸生産量 (g/l)

グルコース量%	1	3	4	8
通気の有無				
有	0.5 g	2.0 g	2.1 g	4.0 g
無	—	—	0.05 g	—

特開昭58- 56692(3)

グルコース8%添加時のヒアルロン酸の収量は常法に従い精製した結果4.0g/lであった。

培養時においては通気攪拌が必須である。通気攪拌の方法としては振とう培養あるいは空気吹込みによる通常の通気攪拌培養があるが、いずれを使用してもよい。その際、攪拌力は弱く、通気量を多くした方がよい結果が得られる。通気の有無を表-Ⅱに示す。通気する事によって収量が明らかに増加することが分かる。

さらに培養時に、アルカリ水溶液にてpHを5.5~9.0に調整するとヒアルロン酸が安定に生成出来、より好ましい。アルカリ水溶液としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩基性アミノ酸、低級アミン等の通常用いられるアルカリの単独あるいは混合溶液が使用出来る。

培養後培養液中に蓄積されたヒアルロン酸を分離、採取するにあたっては、培地を酸性にして処理すると純度がよくなり処理しやすい。

ヒアルロン酸の分離には従来から行われている多糖類の分離採取法が利用出来る。

次にストレプトコッカス、（改訂）ズーエビデミカスで培養して得られた精製ヒアルロン酸性質を以下に述べる。

呈色反応

アンスロン——硫酸反応：緑色

カルバゾール——硫酸反応：紅色

赤外吸収スペクトル

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルは第1図の通りである。

0.1%水溶液の比旋光度： $(\alpha)_{D}^{20} = -67.5^{\circ}$

電気泳動による分析

等速電気泳動のチャートを示した。

泳動条件は下記の通りで、本多糖のポテンシャルユニットバリュー（Potential Unit Value）は0.23であるところから、本粘質物はヒアルロン酸であることを確認した。

例えば培養液中の菌体、その他の不溶成分は濾過又は遠心分離等により分離除去する。溶液中に混在する蛋白質はトリクロル酢酸、又はクロロホルム、イソアミルアルコール混液での除去あるいは活性白土、活性炭等の吸着剤あるいはペプシン、ババイン、プロナーゼ等の蛋白質分解酵素にて除去することが出来る。

また、混在する低分子物質は限外濾過、透析あるいは有機溶媒再沈法等により分離除去する。その後有機溶媒による沈澱法又はカチオン活性剤による吸着法で精製後凍結乾燥、噴霧乾燥あるいは溶媒沈澱法等の方法でヒアルロン酸単離する事が出来る。

このようにして得られたヒアルロン酸は水に可溶、メタノール、エタノール、アセトン、クロロホルム、エーテル等の有機溶媒には不溶の白色繊維状、無味、無臭の乾燥物である。

泳動条件

リーディング液	0.01M、HCl β -Ala., pH3.2、トリトンX-100、0.1%
ターミナル液	0.01M カブロン酸
泳動電流	100 μ A
キャピラリチューブ	20cm \times 0.5 mm ϕ
恒温槽温度	20°C
チャートスピード	10mm/min

ポテンシャルユニットバリュー

本粘質物	0.23
ヒアルロン酸	0.23
コンドロイチン硫酸	0.11

又、セルロースアセテート膜を用いるろ紙電気泳動法でも0.1M酢酸亜鉛電極液で本多糖はヒアルロン酸と一致した。その際、真菌性ヒアルロニダーゼ（*Streptomyces hyalurolyticus*）で処理後電気泳動にて分析したものは標品と同様スポットを示さず、本酵素により分解される事からもヒアルロン酸である事が確認出来た。

実施例 1

グルコース 8%、酵母エキス 0.5%、ペプトン 1.5%、リン酸第 1 水素カリウム 0.2%、チオ硫酸ナトリウム 0.1%、亜硫酸ナトリウム 0.02% の組成の培地を 1 ℓ のジャーファーメンター（いわしや製 MA 型 500ml ミニジャー）に 400ml 分注し、120℃、15 分間加熱殺菌後、前培養したストレプトコッカス・ズーエビデミカスを接種し、pH 7、33℃で 4 日間通気攪拌（通気量 2 ℓ/min、回転数 200 rpm）培養した。

培養終了後培養液より遠心分離により、菌体及びその他の夾雑物を除去し、上澄液へ 2 倍量のエタノールを攪拌しつつ加えると繊維状物質が沈殿した。これを分別した後、エーテル、ついでエタノールで充分洗浄後、再び水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿を浮取し、水および 0.1M NaCl 水溶液にて十分洗浄後 0.5M NaCl にてヒアルロン酸を抽出し、その溶液を透析法により脱塩後、溶液を凍結乾燥して培養液 1 ℓ より 4.0g のヒアルロン酸を得た。本品は市販電

気泳動にて標品のヒアルロン酸と同じ位置に泳動され、等速電気泳動のユニットバリューも 0.23 と標品のそれと一致した。さらに赤外線吸収スペクトルも標品のスペクトルと一致した。

一方、グルコース 8% の代りにグルコース 1% 添加した培地で同様にストレプトコッカス・ズーエビデミカスを培養した場合には、培養液 1 ℓ より 0.5g/ℓ のヒアルロン酸が得られたにすぎなかった。

実施例 2

実施例 1 に於て使用した培地中のグルコースの量を 4% におきかえた培地を用いてストレプトコッカス・ズーエビデミカスを実施例 1 と同様の方法で培養した。ヒアルロン酸の収量は 2.1g/ℓ であった。ただし、本条件で通気攪拌しなかった場合の収量は 0.05g/ℓ と低かった。

実施例 3

実施例 1 に於て使用した培地中のグルコースの量を 3% におきかえた培地を用いてストレプトコッカス・ズーエビデミカスを実施例 1 と同様の方法で培養し、処理した。ヒアルロン酸の収量は、2.0g/ℓ であった。

実施例 4

実施例 1 と同様の方法でストレプトコッカス・エキ（ATCC 9527）を培養し、培養液からヒアルロン酸を単離精製し、培養液 1 ℓ より 3.8g のヒアルロン酸を得た。

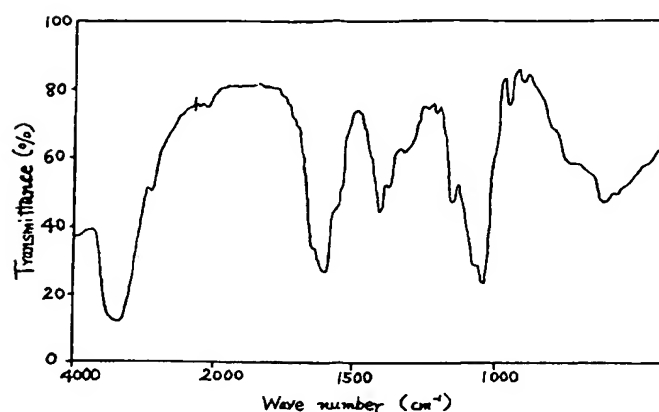
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本培養により得たヒアルロン酸の赤外線吸収スペクトルである。

第 2 図は本培養により得たヒアルロン酸の等速電気泳動のチャートである。

特許出願人 株式会社 資 生 堂

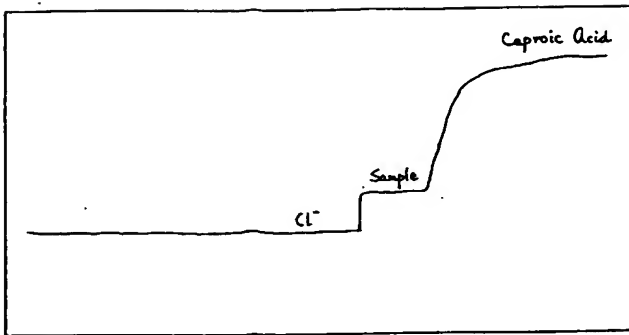
第 1 図



昭和55年11月7日

特許庁長官 島 田 春 樹 殿

第 2 図



1. 事件の表示

昭和56年特許願第152355号

2. 発明の名称

サン セイゾウホウ
ヒアルロン酸の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区銀座4丁目5番5号

名 称 (195) 株式会社山本吉兵衛

代表者 山 本 吉 兵 衛

(電話番号 東京(572)5111内線2131)

4. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

5. 補正の内容

- (1) 明細書の第4頁第17行～18行目の「原料」を「原料」と補正します。
- (2) 明細書の第5頁第1行目の「炭素塩」を「炭酸塩」と補正します。
- (3) 明細書の第7頁第10行目の「水浴液」を「水溶液」と補正します。
- (4) 明細書の第9頁第10行目の「 $(\alpha)_0^\infty - - 67.5^\circ$ 」を「 $(\alpha)_D^{20} - - 67.5^\circ$ 」と補正します。
- (5) 明細書の第11頁第5行目～第6行目の「1ℓのジャーフェーマンター(いわしや製MA型500 mlミニジャー)」を「いわしや製MA型500 mlミニジャー」と補正します。

BEST AVAILABLE COPY